

基础研究

Exendin-4对高糖条件下人系膜细胞细胞外基质代谢的影响

肖知周,关美萍,郑宗基,贾懿劼,王玲,薛耀明

南方医科大学南方医院内分泌代谢科,广东 广州 510515

摘要:目的 探讨exendin-4对高糖条件下人系膜细胞(HMC)细胞外基质(ECM)代谢的影响及其可能的机制。方法 取对数生长期的HMC分为正常对照(NG)组、渗透压对照(Man)组、高糖(HG)组和高糖联合不同浓度exendin-4(1、10、100 nmol/L)组。体外培养HMC,采用cck8法测24 h HMC增殖情况;Western Blotting检测细胞培养15 min后细胞外调节激酶(ERK)/p-ERK蛋白表达情况,24 h后I型胶原、纤维连接蛋白(FN)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)蛋白表达情况。结果 CCK-8结果显示高糖诱导HMC 24 h后可见细胞增殖明显增强(1 ± 0.06 vs 1.20 ± 0.07 , $P<0.001$),加入exendin-4后可抑制细胞增殖(1.12 ± 0.02 vs 1.20 ± 0.07 , $P<0.05$, 1.05 ± 0.08 vs 1.20 ± 0.07 , $P<0.001$)。细胞培养24 h后,与NG组相比,HG组细胞I型胶原、FN、TGF- β 1蛋白表达量均显著增加($P<0.001$);与HG组相比,高糖联合exendin-4组I型胶原、FN、TGF- β 1蛋白表达量均显著降低($P<0.01$)。细胞培养15 min后,与NG组相比,HG组细胞ERK磷酸化蛋白表达量较NG组显著增加($P<0.001$);与HG组相比,高糖联合exendin-4组ERK磷酸化蛋白表达量显著下降($P<0.001$)。渗透压对照组与正常对照组各指标间差异均无统计学意义。结论 exendin-4可能通过抑制TGF- β 1/ERK通路活性对高糖条件下HMC ECM代谢起到了保护性的调节作用。

关键词:exendin-4;人系膜细胞;细胞外基质;高糖

Effects of exendin-4 on extracellular matrix metabolism in human mesangial cells cultured in high glucose

XIAO Zhizhou, GUAN Meiping, ZHENG Zongji, JIA Yijie, WANG Ling, XUE Yaoming

Department of Endocrinology and Metabolism, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore effects of exendin-4 on the metabolism of extracellular matrix (ECM) in human mesangial cells (HMC) cultured in the presence of high glucose and explore the possible mechanism. **Methods** Human mesangial cells (HMC) were treated with exendin-4 under high glucose conditions. The cell proliferation was observed using CCK8 assay, and the expressions of collagen type I, fibronectin, transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) expression and extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway activity were assessed using Western blotting. **Results** Exendin-4 inhibited cell proliferation and the expressions of collagen type I, fibronectin and TGF β 1 and reversed ERK phosphorylation in high glucose-induced HMC. **Conclusion** Exendin-4 can regulate ECM metabolism in HMC cultured in high glucose by inhibiting TGF β 1/ERK pathway, suggesting the beneficial effects of exendin-4 in preventing and treating diabetic nephropathy.

Key words: exendin-4; human mesangial cell; extracellular matrix; high glucose

糖尿病肾病(DN)是全球范围内引起肾衰的首要因素。此外,DN可增加患者的心血管事件及全因死亡率^[1]。肾小球系膜细胞增殖、ECM沉积和肾小球基底膜增厚是DN的主要病理改变^[2]。Exendin4是一种从希拉毒蜥的唾液中分离得到的含39个氨基酸的多肽化合物^[3]。与哺乳动物胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的氨基酸序列53%同源^[4]。已有研究表明,exendin-4对db/db小鼠有一定的肾脏保护作用^[5],对HMC有一定的抗纤维化作用^[6]。但是exendin-4发挥

肾脏保护作用的机制尚不清楚,目前关于这方面的研究较少。因此本研究采用高糖刺激下HMC为体外模型,观察exendin-4对高糖刺激下HMC损伤的保护作用并探讨其可能的保护机制,为exendin-4用于DN的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HMC购于美国ScienCell公司

1.1.2 主要试剂耗材 Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒)(碧云天生物);Antibody p44/p42 MAPK(ERK1/2)、Antibody Phospho-p44/42 MAPK(ERK1/2)(Cell Signaling),Antibody β -actin(中杉金桥生物),Antibody TGF-beta1(RnD),Antibody Fibronectin(sigma),Antibody Collagen Type 1(merck millipore),抗兔、抗鼠荧

收稿日期:2015-11-22

基金项目:国家自然科学基金(31400992);广东省自然科学基金(2014A030313290);南方医科大学南方医院院长基金(2013B021)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31400992).

作者简介:肖知周,在读硕士研究生,E-mail: xiaozhizhou0701@163.com

通信作者:薛耀明,教授,主任医师,电话:020-61641631, E-mail: xymbright@163.com

光二抗(LI-COR Biosciences), exendin-4 购于 sigma-Aldrich, DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶购于 Gibco, 0.45 μ m PVDF 膜购于 Millipore。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组干预 HMC 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μ g/mL)的 DMEM 低糖培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱内培养,2~3 d 换培养液,细胞生长至 90% 融合时传代。细胞进入对数生长期后,用 0.25% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液后分组用于实验。实验分组:正常对照组(NG 组,葡萄糖浓度 5.6 mmol/L),渗透压对照组(Man 组, 5.6 mmol/L 葡萄糖+24.4 mmol/L 甘露醇),高糖组(HG 组,葡萄糖浓度 30 mmol/L),高糖联合不同浓度 exendin-4 组(HG+1 nmol/L exendin-4 组、HG+10 nmol/L exendin-4 组、HG+100 nmol/L exendin-4 组)。

1.2.2 HMC 增殖的测定 取对数期生长的 HMC 接种于 96 孔培养板中,使每孔含细胞约 4×10^3 个。先用含 1% 胎牛血清的培养基培养 24 h,使细胞同步于静止期,按 1.2.1 所述方法分组培养 24 h。终止前 1 h 在每个孔内加入 CCK-8 溶液 10 μ L,混匀后 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 1 h,用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长检测每孔吸光度值。实验重复 3 次。

1.2.3 Western Blotting 检测 I 型胶原、FN、TGF- β 1、ERK/p-ERK 表达 HMC 分组同上,不同实验分组干预结束后,用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。取变性蛋白样品 20 μ g 以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,PVDF 膜转移后,室温封闭 1 h 后加入 1:1000 稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,置于荧光二抗(1:15 000)室温孵育 1 h,使用 Odyssey 双色红外荧光扫描成像系统获得图片,运用 Quantity One 图像分析软件测得条带灰度值,将各目的条带与内参条带比值后,比较各组间差异。实验重复 3 次。

1.2.4 统计学处理 所有数据均以均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,多组间采用 One-way ANOVA 进行统计,两两比较使用 LSD 检验, P 值小于 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 exendin-4 对高糖诱导的 HMC 增殖的影响

孵育 24 h 后,NG 和 Man 组细胞增殖无明显差异。与 NG 组相比,HG 组细胞增殖明显增强(1 ± 0.06 vs 1.20 ± 0.07 , $P < 0.001$);1 nmol/L 浓度的 exendin-4 对高糖诱导的人系膜细胞增殖水平的影响无统计学差异。10、100 nmol/L 浓度的 exendin-4 均可下调高糖诱导的 HMC 增殖(1.12 ± 0.02 vs 1.20 ± 0.07 , $P < 0.05$, 1.05 ± 0.08 vs 1.20 ± 0.07 , $P < 0.001$),且 exendin-4 浓度越高抑制作用越明显(图 1)。

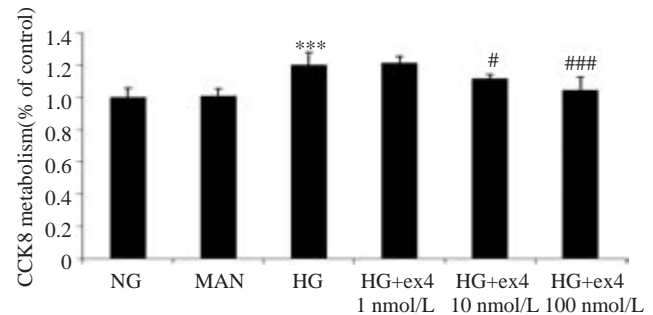


图1 exendin-4 对高糖诱导的 HMC 增殖的影响

Fig.1 CCK8 assay of effects of exendin-4 on proliferation of high glucose-induced HMC. *** $P < 0.001$ vs NG group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs HG group.

2.2 exendin-4 对高糖诱导的人肾小球系膜细胞 I 型胶原、FN 蛋白表达的影响

孵育 24 h 后,NG 和 Man 组 HMC 的 I 型胶原、FN 蛋白表达量无明显差异。与 NG 组相比,HG 组蛋白表达量显著增加($P < 0.001$);1、10、100 nmol/L 浓度的 exendin-4 均可下调高糖诱导的 HMC 的 I 型胶原、FN 表达,且 exendin-4 浓度越高抑制作用越明显(图 2)。

2.3 exendin-4 对高糖诱导的人肾小球系膜细胞 TGF β 1 蛋白表达的影响

孵育 24 h 后,NG 和 Man 组 HMC 的 TGF β 1 蛋白表达量无明显差异。与 NG 组相比,HG 组蛋白表达量显著增加($P < 0.001$);1、10、100 nmol/L 浓度的 exendin-4 均可下调高糖诱导的 HMC 的 TGF β 1 表达,且 exendin-4 浓度越高抑制作用越明显($P < 0.01$,图 3)。

2.4 HG 诱导 HMC 不同时间点 ERK 磷酸化蛋白的表达

图 4 显示 HG 0 min (HG 0') HMC 有少量磷酸化 ERK 蛋白表达,HG 刺激 15 min (HG 15') 后 ERK 磷酸化蛋白表达明显增多,刺激 30 min (HG 30') 后 ERK 磷酸化蛋白的表达开始减弱,刺激至 4 h (HG 240') ERK 磷酸化蛋白的表达仍未消失。统计学分析显示 HG 刺激各时间点 HMC 磷酸化 ERK (p-ERK)/总 ERK (t-ERK) 蛋白相对表达量有显著差异。

2.5 exendin-4 对高糖诱导的人肾小球系膜细胞 ERK 磷酸化蛋白表达的影响

2.4 节结果显示 HG 刺激 HMC 15 min 能激活 ERK,增加 ERK 磷酸化蛋白的表达。因此本组实验各不同处理组刺激细胞时间为 15 min。15 min 后,NG 组和 Man 组的 ERK 磷酸化蛋白表达无明显差异,HG 组 HMC ERK 磷酸化蛋白表达比 NG 组明显增多($P < 0.001$),与 HG 组比较,HG 联合不同浓度的 exendin-4 培养细胞,随着 exendin-4 药物浓度的增加,细胞 ERK 磷酸化蛋白表达水平逐渐减少($P < 0.001$,图 5)。

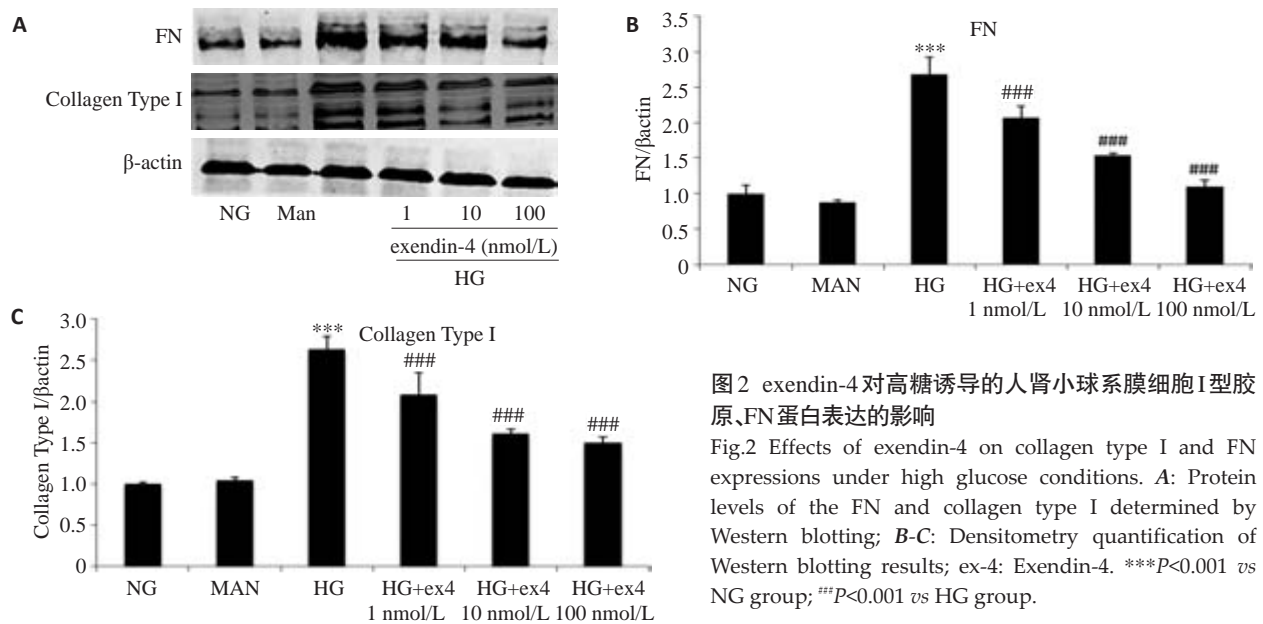


图2 exendin-4对高糖诱导的人肾小球系膜细胞I型胶原、FN蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of exendin-4 on collagen type I and FN expressions under high glucose conditions. A: Protein levels of the FN and collagen type I determined by Western blotting; B-C: Densitometry quantification of Western blotting results; ex-4: Exendin-4. *** $P < 0.001$ vs NG group; ### $P < 0.001$ vs HG group.

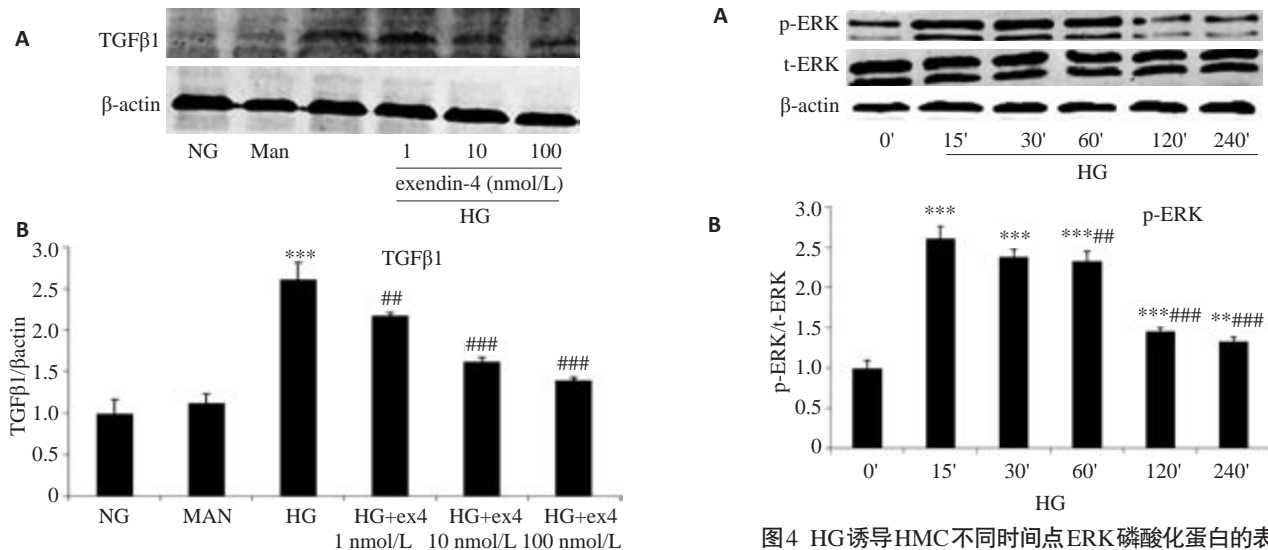


图3 exendin-4对高糖诱导的人肾小球系膜细胞TGF-β1蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of exendin-4 on TGF-β1 expression under high glucose conditions. A: Protein levels of TGF-β1 determined by Western blotting; B: Densitometry quantification of Western blotting results. ex-4: Exendin-4. *** $P < 0.001$ vs NG group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HG group.

3 讨论

GLP-1通过它的高亲和力受体,人胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)增加了葡萄糖诱导的胰岛β细胞分泌的胰岛素,抑制了胰高血糖素的分泌。GLP-1R存在于胰岛外组织,比如肾脏(包括肾小球系膜细胞^[7])、血管组织和中央神经组织。有研究表明,GLP-1R的表达增多可在人肾小管上皮细胞及SD糖尿病大鼠中发挥肾脏保护作用^[8],GLP-1还可与肾小球系膜细胞上的GLP-1R结合抑制糖基化终产物的生成,起到局部改善糖尿病肾病的作用^[9]。但是内源性的GLP-1会迅速被二肽基肽酶(DPP-4)降解,限制了其应用。所以可以抵抗DPP-4

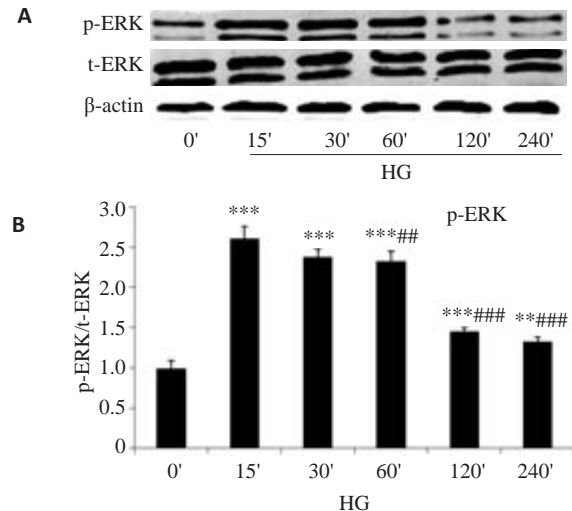


图4 HG诱导HMC不同时间点ERK磷酸化蛋白的表达

Fig.4 Effects of high glucose on ERK phosphorylation in HMC. A: Protein levels of p-EERK determined by Western blotting; B: Densitometry quantification of Western blotting results. *** $P < 0.001$ vs HG 0' group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HG 15' group.

的GLP-1R激动剂,比如exendin-4开始应用于治疗2型糖尿病患者,已有皮下注射剂获美国FDA批准如艾塞那肽注射液。PARK的研究表明,8周的exendin-4治疗可改善db/db小鼠的糖尿病肾病和代谢异常^[5]。

在实验动物模型中,系膜细胞增殖常常先于ECM的沉积,其为肾小球毛细血管的一部分,被碱性成纤维生长因子刺激后开始增殖。系膜细胞增殖受到包括血小板衍生生长因子在内的自身内分泌机制的调节^[10]。本研究通过cck8表明,高糖可诱导系膜细胞增殖,与文献报道一致^[11]。同时本研究表明exendin-4可以抑制系膜细胞增殖,并呈浓度依赖性。

此外,本研究表明exendin-4可抑制高糖刺激导致的I型胶原、FN表达升高。I型胶原、FN是ECM中重

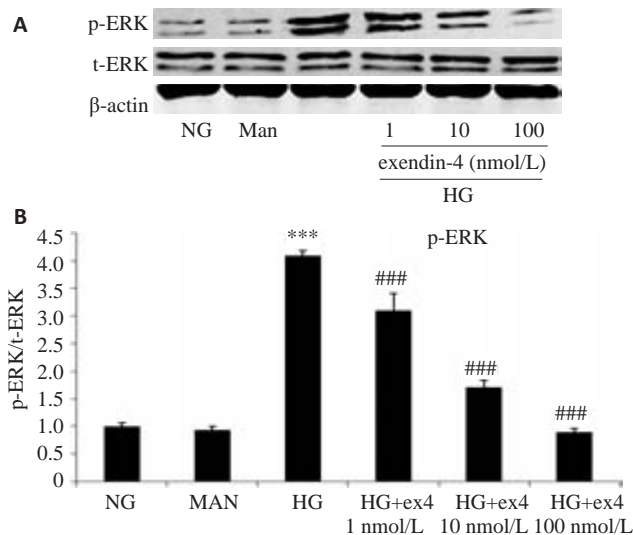


图5 exendin-4对高糖诱导的人肾小球系膜细胞p-ERK蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of exendin-4 on p-ERK under high glucose conditions. A: Protein levels of the p-EERK were determined by Western blotting; B: Densitometry quantification of Western blotting results. ex-4: Exendin-4. *** $P < 0.001$ vs NG group; ### $P < 0.001$ vs HG group.

要的蛋白,在系膜细胞中高糖刺激引起的I型胶原、FN表达增多导致肾小球硬化加速,抑制I型胶原、FN的表达可减轻肾小球硬化^[12-13]。TGF-β1是在包括糖尿病肾病等许多肾脏疾病中的肾小球硬化和肾间质纤维化中起重要作用的纤维化和炎症因子,高血糖引起的TGF-β1的异常产生导致ECM蛋白的过度沉积,例如胶原和FN,最终导致肾小球系膜扩张和肾小球基底膜增厚^[14]。因此,TGF-β1被认为是DN治疗中的一个干预目标。本研究表明高糖刺激的HMC TGF-β1蛋白表达升高,exendin-4处理可抑制TGF-β1蛋白表达。

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族中的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),可受多种细胞外刺激调节细胞内信号传导,MAPK亚家族包括ERK、c-Jun氨基末端激酶(JNK)和P38 MAPK^[15]。已有研究表明TGF-β1激活非经典smad通路的ERK通路以后,可增加HMC I型胶原的合成^[16]。另有研究者发现,TGF-β1通过ERK1/2途径,导致肾小管细胞ECM沉积^[17]。TGF-β1/ERK是否参与exendin-4对DN的改善尚未见阐明。本研究表明高糖刺激HMC后ERK磷酸化蛋白表达明显升高,与TGF-β1相关,exendin-4处理后可抑制ERK磷酸化蛋白表达。由于MAPK信号通路之间存在交互和协同作用,因此仍需要进一步研究它们之间的作用及作用机制。

综上所述,exendin-4可通过抑制TGF-β1/ERK信号通路抑制高糖刺激下HMC的增殖和I型胶原、FN的分泌,且该抑制作用具有一定的量效关系。由此推测,exendin-4可能在延缓DN肾小球硬化的进程中发挥了积极的作用。

参考文献:

[1] Eboh C, Chowdhury TA. Management of diabetic renal disease[J].

Ann transl med, 2015, 3(11): 154.

- [2] Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Nature Clin Prac Endocrinol Metabol, 2008, 4(8): 444-52.
- [3] Eng J, Kleinman WA, Singh L, et al. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from Guinea pig pancreas[J]. J Biol Chem, 1992, 267(11): 7402-5.
- [4] Göke R, Fehmann HC, Linn T, et al. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells[J]. J Biol Chem, 1993, 268(26): 19650-5.
- [5] Park CW, Kim HW, Ko SH, et al. Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(4): 1227-38.
- [6] Li W, Cui M, Wei Y, et al. Inhibition of the expression of TGF-β1 and CTGF in human mesangial cells by exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 30(3): 749-57.
- [7] Kim DI, Park MJ, Heo YR, et al. Metformin ameliorates lipotoxicity-induced mesangial cell apoptosis partly via upregulation of glucagon like peptide-1 receptor (GLP-1R) [J]. Arch Biochem Biophys, 2015, 584: 90-7.
- [8] Zhao X, Liu G, Shen H, et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(3): 684-92.
- [9] Ishibashi Y, Nishino Y, Matsui T, et al. Glucagon-like peptide-1 suppresses advanced glycation end product-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells by reducing advanced glycation end product receptor level [J]. Metabolism, 2011, 60(9): 1271-7.
- [10] Gruden G, Perin PC, Camussi G. Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology[J]. Curr Diabetes Rev, 2005, 1(1): 27-40.
- [11] Gao J, Wang F, Wang W, et al. Emodin suppresses hyperglycemia-induced proliferation and fibronectin expression in mesangial cells via inhibiting cFLIP[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93588.
- [12] Hornigold N, Johnson TS, Huang L, et al. Inhibition of collagen I accumulation reduces glomerulosclerosis by a Hic-5-dependent mechanism in experimental diabetic nephropathy [J]. Lab Invest, 2013, 93(5): 553-65.
- [13] Dixon AJ, Burns J, Dunnill MS, et al. Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys[J]. J Clin Pathol, 1980, 33(11): 1021-8.
- [14] Garud MS, Kulkarni YA. Hyperglycemia to nephropathy via transforming growth factor beta[J]. Curr Diabetes Rev, 2014, 10(3): 182-9.
- [15] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. BBA Mol Bas Dis, 2010, 1802(4): 396-405.
- [16] Hayashida T, Decaestecker M, Schnaper HW. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells [J]. FASEB J, 2003, 17(11): 1576-8.
- [17] Xiao HB, Liu RH, Ling GH, et al. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF-β1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303(5): F757-65.

(编辑: 经 媛)